Journal of Horticultural Science
https:// jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 1, Spring 2022, p. 259-269

Canonical Correlation between Morphological and Phytochemical Characteristics of Five Varieties of *Phalaenopsis* Orchids

F. Bidarnamani[1*], S.N. Mortazavi[2], Y. Shiri[3]

Received: 19-04-2021 Revised: 02-05-2021 Accepted: 15-06-2021 Available Online: 20-06-2022	**How to cite this article:** Bidarnamani F., Mortazavi S.N., and Shiri Y. 2022. Canonical Correlation between Morphological and Phytochemical Characteristics of Five Varieties of *Phalaenopsis* Orchids. Journal of Horticultural Science 36(1): 259-269. (In Persian with English Abstract) **DOI:** 10.22067/JHS.2021.69819.1042

Introduction

Phalaenopsis is one of the beautiful and commercial species of orchid family that there is little research on its medicinal properties. Phalaenopsis orchids can be grown outdoors in warm, humid conditions that are damp but not wet, in a location that is shady but bright. Since the introduction of orchid meristem culture in 1960, branching in micro-propagation methods develop based on using two clearly different culture schemes. It have been used from medicinal properties of orchids for anti-rheumatic, anti-inflammatory, anti-viral, anti-cancer, anti-seizure, diuretic, nutrient protection, relaxation, anti-aging, wound healing, hypoglycemia, anti-tumor, antimicrobial, antibacterial, anti-oxidants and anti-diarrhea.

Material and Methods

The purpose of this study was to evaluate the canonical correlation between morphological and phytochemical characteristics of five *phalaenopsis* orchid varieties: Nottingham, Bucharest, Andorra, Memphis, and Dubrovnik. Micro-propagation of orchid seeds was performed after sterilization of capsules by bleach and ethanol. Leaf and root organs of 5 orchid varieties were harvested from Chen medium in Institute of Agricultural Research, University of Zabol, on 2020. The sliced samples were dried in an oven at 50 °C for 72 hours, after separating the leaves and roots of each variety. The powdered leaves and roots of each variety (5 g) were separately immersed in 50 ml of ethanol for 24 hours at room temperature. Then the extracts were placed on a shaker at room temperature at 120 rpm.

Result and Discussion

The results showed that the first two canonical variables were significant and third variable was not significant. The first canonical variable has the highest special value of 65.83 and the second and third canonical variables have 4.59 and 0.10 special values, respectively. According to this research the first canonical variable with the highest special values, square of canonical correlation and the most cumulative percentages should be studied in all morphological and phytochemical characteristics. Significant canonical correlation in morphological characteristics fit 94% of the total variance of physiological variables, while significant canonical variables in phytochemical characteristics fit 100% of the variance of phytochemical characteristics. Due to the fact that phalaenopsis orchid flower has many leaf and root wastes, the findings of this study show that due to the medicinal properties of this plant, we can reduce the waste of this plant in greenhouses and production centers of this flower. In this study, the amount of phenol, flavonoid and antioxidants were determined. Also the relationship between morphological and phytochemical traits showed that this plant has medicinal properties. The lowest number of leaves belongs to Memphis variety and the highest number of leaves belongs to Nottingham variety, among the studied varieties. Therefore, it can be concluded that the roots are longer and

1- Assistant Professor, Institute of Agricultural Research, University of Zabol, Zabol, Iran
(*- Corresponding Author Email: f.bidarnamani65@uoz.ac.ir)
2- Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3- Assistant Professor, Institute of Agricultural Research, University of Zabol, Zabol, Iran

shorter in orchid varieties with white (Nottingham) and purple (Memphis) flower respectively. Also, the second focal variable of root trait with the highest coefficient had a negative correlation with the number of leaves and root length, which shows that in the second correlation of the number of leaves and root length, the number of roots will decrease. In the second focal variable, the number of roots had a positive focal correlation with leaf length. That is, the closer we get to the second center of correlations between morphological traits, the more direct and positive becomes the relationship between root number and leaf length traits.

Conclusion

According to the results and high percentage of fitness in phytochemical characteristics, it can be concluded that phytochemical traits can more precisely express the correlation between the traits. Also it showed significance of canonical correlation between two variable groups, the relationship between phytochemical and morphological traits of five varieties of *phalaenopsis* orchid. In general, the results of this study showed orchid varieties have high phenolic and flavonoid compounds and have the highest restraint power of free radical in canonical correlation, and they can be used as medicine. In this study, it was found that Phalaenopsis orchid varieties had phenolic content and good antioxidant capacity relatively and there was a high positive correlation between morphological and phytochemical traits and enhanced with adding the plant's length or number of leaves containing phytochemical compounds. Also, according to the results of this study and similar findings in other research, it was found that the production of secondary metabolites of orchids and other plants under the influence of genetic and environmental conditions can affect the production and amounts of chemical compounds and medicinal performance of plants.

Keywords: Medicinal traits, Phenol, Secondary metabolite, Morphology

نشریه علوم باغبانی
https:// jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، ص ۲۶۹-۲۵۹

همبستگی کانونی صفات مورفولوژی و فیتوشیمیایی پنج رقم ارکیده فالانوپسیس

فاطمه بیدرنامنی[1]*- سید نجم الدین مرتضوی[2]- یعثوب شیری[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۵

چکیده

ارکیده فالانوپسیس یکی از گونه‌های زیبا و تجاری از خانواده ارکیده بوده و تحقیقات در زمینه خواص دارویی آن اندک است. این تحقیق با هدف ارزیابی همبستگی کانونی صفات ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی پنج رقم ارکیده فالانوپسیس شامل 'Andorra'، 'Memphis'، 'Dubrovnik'، 'Bucharest' و 'Nottingham' انجام شد. اندام‌های برگ و ریشه حاصل از کشت بافت بذر ۵ رقم ارکیده در محیط کشت Chen در پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۹ برداشت شد. فاکتورهای تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ اندازه‌گیری شد. پس از تهیه عصاره اتانولی برگ و ریشه میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی و در نهایت همبستگی کانونی بین صفات مورفولوژی و فیتوشیمیایی محاسبه شد. نتایج نشان داد که دو متغیر کانونی اول معنی‌دار می‌باشد و متغیر سوم معنی‌دار نشد. اولین متغیر کانونی دارای بیشترین مقدار ویژه ۶۵/۸۳ است و متغیر دوم و سوم کانونی به ترتیب دارای ۴/۵۹ و ۰/۱۰ مقادیر ویژه است. با توجه به نتایج این تحقیق، متغیر کانونی اول با بالاترین مقادیر ویژه، مربع همبستگی کانونی و بیشترین درصد تجمعی باید در تمام صفات ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گیرد. متغیرهای کانونی معنی‌دار در صفات ریخت شناسی، ۹۴ درصد از واریانس کل متغیرهای فیزیولوژیک را برازش می‌کند. در حالی که متغیرهای کانونی معنی‌دار در صفات فیتوشیمیایی ۱۰۰ درصد از واریانس صفات فیتوشیمیایی را برازش می‌کند. با توجه به نتایج به دست آمده و درصد بالای برازش در صفات فیتوشیمیایی می‌توان نتیجه گرفت صفات فیتوشیمیایی می‌توانند با دقت بیشتری همبستگی بین صفات را بیان کنند. همچنین معنی‌داری همبستگی کانونی بین دو گروه متغیر، ارتباط بین صفات فیتوشیمیایی و ریخت‌شناسی پنج رقم ارکیده فالانوپسیس را نشان داد. به طورکلی آنالیز نتایج این تحقیق نشان داد ارقام ارکیده دارای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بالایی بوده و بالاترین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد را در همبستگی کانونی داشته‌اند، می‌توان از آن‌ها به عنوان دارو استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: خاصیت دارویی، فنول، متابولیت ثانویه، مورفولوژی

مقدمه

تولید متابولیت‌های ثانویه به عنوان بخشی از سیستم دفاعی گیاه می‌باشد، علاوه بر آن بخش‌های مهمی از کیفیت غذای انسان مانند رنگ، بو و طعم را نیز مشخص می‌کند. برخی از متابولیت‌های ثانویه نظیر رنگدانه‌های گیاهی برای تنوع گل‌ها و گیاهان زینتی مهم است و تعدادی از این متابولیت‌ها برای تولید داروها، حشره‌کش‌ها، ادویه‌ها، رنگ‌ها و خوشبوکننده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Rao and Ravishankar, 2002). ترکیبات فنلی در بین متابولیت‌های ثانویه گیاهی، به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و معمولا به عنوان آنتی اکسیدان کاربردهای فراوانی دارند (De La Torre and Albericio, 2020). تجزیه تشخیص کانونی یکی از روش‌های آماری چندمتغیره است که همه صفات به‌طور همزمان در تفاوت بین ارقام مورد بررسی قرار می‌گیرند، این روش مقایسه بسیار قوی از جمعیت‌ها را نسبت به آنچه از تجزیه تک متغیره بدست می‌آید فراهم می‌سازد (Yeater *et al.*, 2004). تجزیه تشخیص کانونی می‌تواند اثرهای بین جمعیت‌ها را از اثرهای درون جمعیت‌ها به وسیله حداکثر کردن تشخیص بین جمعیت ها زمانی که در مقابل تنوع درون جمعیت‌ها آزمون می‌شود جدا کند (Riggs, 1973). نتایج تحقیقی بر

۱- استادیار پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، دانشگاه زابل، زابل، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: f.bidarnamani65@uoz.ac.ir)
۲ - دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳- استادیار پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، دانشگاه زابل، زابل، ایران
DOI: 10.22067/JHS.2021.69819.1042

روی تأثیر عصاره آبی و اتانولی گیاه سماق نشان داد مقدار فنول و فلاونوئید کل در عصاره آبی بالاتر از عصاره اتانولی بود و عصاره آبی سماق فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار رادیکالی موثرتری نسبت به عصاره اتانولی داشت (Bursal and Koksal, 2011).

گونه‌ی *Phalaenopsis* spp. از نظر تجاری و اقتصادی جزو مهمترین ارکیده‌ها بوده و قسمت‌های گیاهی آن اغلب بدون استفاده مانده و سبب آلودگی محیط می گردد. تاکنون گزارش‌های مربوط به آنالیزهای فیتوشیمیایی معمولا در مورد ارکیده‌های در معرض خطر انقراض و دارویی وجود داشت؛ در گزارشی محققین پیشنهاد دادند عصاره ریشه هیبرید فالانوپسیس می‌تواند منبع مناسبی از آنتی اکسیدانت‌های طبیعی باشد؛ بنابراین می‌توان از ضایعات این گیاه در تولید صنعتی با اهداف دارویی استفاده کرد (Minh *et al*., 2016). چندین ترکیب شیمیایی با اهمیت داروئی مانند آلکالوئیدها، پلی فنول‌ها، آنتوسیانین‌ها و کاروتنوئیدها در بافت‌های نمویافته در شرایط درون‌شیشه‌ای سنتز می‌شوند (Bhattacharjee *et al*., 2015). به‌تازگی مطالعات بر تولید پروتوکورم و کالوس برای استخراج ترکیبات بیواکتیو در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای از طریق سوسپانسیون و بیوراکتور متمرکز شده است (Pant *et al*., 2014؛ Pant *et al*., 2019). در مطالعه‌ای ترکیبات شیمیایی و آنالیزهای بیوشیمیایی، فعالیت اکسیدانی برگ‌ها و گل‌های ارکیده فالانوپسیس و ترکیبات شیمیایی و خصوصیات ضدرادیکالی *Dendrobium speciosum* ارزیابی شد (Ling and Subramaniam, 2007). در مطالعه‌ای که بر روی عصاره و برگ گل‌های هیبریدی فالانوپسیس انجام شد، نتایج نشان داد که عصاره برگ هیبرید Chian Xen Queen حاوی بالاترین فنول کل ۱۱/۵۲ میلی‌گرم و بالاترین فلاونویید کل ۴/۹۸ میلی‌گرم بود؛ همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی ریشه بیشتر از برگ بود (Minh *et al*., 2016). در مطالعه‌ای دیگر نتایج نشان داد پروتوکورم‌های حاصل از کشت بافت بذر ارکیده دندروبیوم، متابولیت‌های ثانویه بیواکتیو را سنتز کرده‌اند، بنابراین، می‌توان از پروتوکورم‌ها برای جداسازی ترکیبات برای فرموله‌کردن داروهای گیاهی بدون آسیب رساندن به جمعیت طبیعی آن گیاه است (Paudel et al., 2020). محققین گزارش کردند عصاره متانولی ارکیده‌های وحشی خاصی در نپال به‌ویژه *D. transparens* و *V. cristata* دارای فعالیت سمیت سلولی معنی‌داری در مقابل سرطان دهانه رحم و سلول‌های تومور مغزی داشتند. عصاره ارکیده حاوی ترکیبات ضد سرطانی و آنتی اکسیدانتی مفید بوده و می تواند منجر به تولید داروهای باارزش شود (De La Torre and Albericio, 2020). ارکیده‌ها به عنوان داروهای آیورودا در هندوستان استفاده می‌گردد (Kala and Senthilkumar, 2010). کوئرسیتین و فرولیک اسید آنتی اکسیدان‌های موجود در ارکیده هستند. مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند کوئرسیتین و اسید فرولیک از سلول‌های اسپرم در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت کرده و سبب بهبود باروری می‌گردد (Yang *et al*., 2006). در مطالعه اقلیما و همکاران بر روی هم‌بستگی کانونی صفات مورفولوژی و فیزیولوژی ۲۲ جمعیت مختلف شیرین‌بیان نتایج نشان داد در تجزیه و تشخیص کانونی دو متغیر کانونی اول معنی‌دار بودند، هر متغیر کانونی، ترکیب خطی مجموعه متغیرهای پیش‌بینی‌کننده و متغیرهای مجموعه اندازه‌گیری‌شده را محاسبه می‌کند (Eghlima *et al*., 2019).

هدف از این مطالعه، بررسی همبستگی کانونی بین صفات ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی عصاره اتانولی برگ و ریشه به منظور تعیین رابطه کانونی بین این صفات می‌باشد. معادلات به دست آمده از رابطه کانونی بین صفات ریخت‌شناسی می‌توانند الگویی برای ارزیابی هر صفت ریخت‌شناسی در صفات فیتوشیمیایی باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌گیاهی

پنج رقم ارکیده فالانوپسیس شامل 'Dubrovnik' با گل زرد، 'Memphis' با گل بنفش، 'Andorra' با گل بنفش خال‌خالی، 'Bucharest' با گل بنفش راه راه و 'Nottingham' با گل سفید از گلخانه‌ای در پاکدشت تهیه شد (شکل ۱). ساقه گل‌دهنده دارای چند غنچه و چند گل بود. گلدان‌ها در گلخانه پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل در دمای حدود ۱۷ درجه سانتی‌گراد شبانه و ۲۹ درجه روزانه نگهداری شدند. در آذرماه ۱۳۹۸ گرده افشانی گل‌ها با استفاده از سرنگ گرده افشانی ارکیده که در اداره ثبت اختراعات و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران ثبت شده است (شماره ثبت اختراع ۰۰۳۶۹۵) انجام شد (شکل ۲). بسته به نوع رقم مدت زمان موردنیاز برای تشکیل کپسول پس از گرده‌افشانی حدود ۱۵۰-۱۲۰ روز بوده است. پس از رسیدن کپسول‌ها، و شستشو و ضدعفونی طی مراحل مختلف با وایتکس و سپس اتانول، بذور ارکیده در محیط Chen کشت شد. تمام شیشه‌های کشت بافتی در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد زیر نور سفید فلورسنت (۵۶ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه) با دوره نوری۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد (Bidarnamani *et al*., 2020). ۶ ماه پس از کشت، نمونه‌ها از شیشه خارج شدند. پس از جداسازی برگ و ریشه هر رقم، نمونه‌ها قطعه قطعه شده در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شد.



شکل ۱- ارقام ارکیده فالانوپسیس
Figure 1- Varieties of Orchid Phalaenopsis



شکل ۲- سرنگ تلقیح ارکیده به شماره ثبت اختراع ۰۰۳۶۹۵
Figure 2- Orchid pollination Syringa with patent number 003695

تهیه عصاره اتانولی

برگ‌ها و ریشه‌های پودر شده هر رقم (۵ گرم) به طور جداگانه در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق غوطه‌ور شدند. سپس عصاره‌ها در دمای معمولی اتاق بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از آن عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شد و عصاره حاصل در یخچال دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Firouzkuhi *et al*., 2018).

سنجش میزان فنل کل

ترکیب‌های فنلی در عصاره اتانولی گیاهی به روش نیل و پارک (Nile and Park, 2013) اندازه‌گیری شد و نتایج براساس میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره اتانولی مشخص شد. بر این اساس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش ریخته شد. ۴۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو و ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه که در دمای محیط مخلوط نگهداری شد، میزان جذب نوری مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شده و مقدار فنل کل محاسبه گردید. واحد میزان فنل کل معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره می‌باشد (Nile and Park, 2013).

معادله (۱) $Y=0.002X+0.014$

Y: مقدار جذب ثبت شده در دستگاه اسپکتوفتومتر

X: میزان فنل کل با واحد ($mg\ GAE.g^{-1}$)

سنجش فلاونوئید کل

مقادیر فلاونوئیدی عصاره‌های برگ و ریشه به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شد. در این روش به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شدند و سپس جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از کویرستین به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم اکی والان کوئرستین (mg QE/g) در هر گرم عصاره مشخص شد (Dai and Mumper, 2010).

معادله (۲) $Y = 0.018 + 0.005X$

Y: مقدار جذب ثبت شده در دستگاه اسپکتوفتومتر

X: میزان فلاونوئید کل

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان

سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH[1] اینگونه بود که بر اساس تغییر رنگ محلول متانولی بنفش رنگ ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل- هیدرازیل به محلول زرد رنگ دی فنیل - پیکریل هیدرازین می‌باشد. ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره با ۷۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH مخلوط شد. این نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق انکوبه شد و سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر مشخص شد (Barros *et al*., 2007).

درصد مهار رادیکال‌های آزاد با فرمول زیر محاسبه می شود.

معادله (۳) درصد مهار رادیکال‌های آزاد $=(A_C-A_S) \times 100$

1- 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl

A_C: میزان جذب برای نمونه شاهد

A_S: میزان جذب برای نمونه گیاهی

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها بـه کمـک نـرم‌افـزار آمـاری SAS version 9.1.0 صـورت گرفـت. تعیـین تعـداد متغیرهـای کـانونی و انتخـاب همبستگی کـانونی مناسـب بـر مبنـای مقـادیر همبسـتگی کانونیـک تصـحیح شـده و آزمـون‌هـای Wilks' Lambda، Pillai's Trace، Hotelling-Lawley Trace و Roy's Greatest Root انجام شد.

نتایج تجزیه همبستگی کانونی

نتـایج تجزیـه همبسـتگی کـانونی صـفات ریخـت‌شناسـی و فیتوشیمیایی پنج رقم ارکیـده فالانوپسـیس نشـان داد کـه دو متغیـر کانونی اول معنی‌دار می‌باشد و متغیر سوم معنـی‌دار نشـد (جـدول ۱).

اولین متغیر کانونی دارای بیشترین مقدار ویـژه ۶۵/۸۳ اسـت و متغیـر دوم و سوم کانونی به ترتیب دارای ۴/۵۹ و ۰/۱۰ مقادیر ویـژه اسـت. نتایج این جدول نشان داد که متغیر کـانونی اول بـا بـالاترین مقـادیر ویژه، مربع همبستگی کانونی و بیشترین درصد تجمعی بایـد در تمـام صـفات ریخـت شناسـی و فیتوشـیمیایی مـورد بررسـی قـرار گیـرد. متغیرهای کانونی معنـی‌دار در صـفات ریخـت‌شناسـی، ۹۴ درصـد از واریانس کل متغیرهای فیزیولوژیک را برازش می‌کنـد. در حـالی کـه متغیرهـای کـانونی معنـی‌دار در صـفات فیتوشـیمیایی ۱۰۰ درصـد از واریانس صفات فیتوشیمیایی را برازش می‌کند. با توجه بـه نتـایج بـه دست آمده و درصد بالای برازش در صـفات فیتوشـیمایی مـی تـوان نتیجه گرفت که صفات فیتوشیمیایی با دقت بیشتری همبستگی بـین صفات را می‌توانند بیان کنند همچنین معنی‌داری همبسـتگی کـانونی بین دو گروه متغیر، ارتباط بین صفات فیتوشـیمیایی و ریخـت‌شناسـی پنج رقم ارکیده فالانوپسیس را نشان داد.

جدول ۱- همبستگی کانونی و سطح احتمال معنی‌دار بودن صفات فیتوشیمیایی و ریخت‌شناسی در ارقام ارکیده فالانوپسیس

Table 1- Canonical correlation and significant probability level of phytochemical and morphological characteristics of Orchid Phalaenopsis varieties

سطح احتمال P value	درصد تجمعی Accumulative percentage	درصد percentage	مقادیر ویژه Special values	مربع همبستگی کانونی Square of canonical correlation	همبستگی کانونی Canonical correlation	متغیر کانونی Canonical variable
0.0001	93.34	93.34	65.83	0.98	0.99	1
0.006	99.85	6.51	4.59	0.46	0.90	2
0.59	100	0.15	0.10	0.09	0.31	3

ضرایب همبستگی رابطه بین متغیرهای کانونی و متغیرهای اصلی را ارزیابی مـی‌کنـد کـه عموما ضـرایب سـاختاری گفتـه مـی‌شـوند (Eghlima *et al.*, 2019). برای بررسی این ارتباط، همبسـتگی بـین متغیرهای کانونی و متغیرهـای اصـلی در تجزیـه همبسـتگی کـانونی برای دو جفت متغیر کانونی اول مقایسه شد.

اولین متغیر کانونی صفات ریخت شناسی، ۸۷/۶۵ درصد از داده‌ها را برازش می‌کند. بالاترین ضریب همبستگی کـانونی اول در صـفات ریخت شناسی مربوط به طول ریشه (r=۰/۹۶) و در همبستگی کانونی دوم مربوط به تعداد ریشه می‌باشـد. اولـین متغیـر کـانونی در صـفات ریخت‌شناسی با صفات تعداد برگ، تعـداد ریشـه، طـول بـرگ، طـول ریشه و طول برگ همبستگی مثبت داشت. بنابراین نتیجه مـی‌گیـریم هر چه به سمت کانون اول همبستگی‌ها نزدیک می‌شویم افزایش هر یک از صفات مورد مطالعه سبب افزایش سایر صفات می‌شود. در ارقام مورد مطالعه، کمتـرین تعـداد بـرگ مربـوط بـه رقـم 'Memphis' و بیشترین تعداد برگ مربوط به رقـم 'Nottingham' اسـت. بنـابراین می‌توان نتیجه گرفت که در ارقام ارکیده با گل سفید طول ریشه‌ها در کشـت درون شیشـه‌ای بیشـتر و در ارقـام ارکیـده بـا گـل بـنفش ('Memphis') طول ریشه‌هـا کمتـر اسـت. همچنـین دومـین متغیـر کانونی صفت تعداد ریشه با بیشترین ضریب با صـفت تعـداد بـرگ و طول ریشه همبستگی منفی داشت که نشان مـی‌دهـد در کـانون دوم همبستگی‌ها هر چه تعداد برگ و طول ریشه بیشتر شود تعـداد ریشـه کمتر خواهد شد. در دومین متغیر کانونی صفت تعداد ریشـه بـا طـول برگ همبستگی کانونی مثبت داشت. یعنی هر چه بـه سـمت کـانون دوم همبستگی‌های بین صفات ریخت‌شناسی نزدیک می‌شویم رابطـه بین صفات تعداد ریشه و طول برگ مستقیم و مثبت می‌شود. از نتایج به دست آمده می‌تـوان نتیجـه گرفـت کـه متغیـر کـانونی اول بهتـر می‌تواند همبستگی بین صفات ریخت‌شناسی را برازش کند.

اولین متغیر کانونی صفات فیتوشیمیایی، ۹۵/۳۶ درصد از داده‌ها را برازش می‌کند (جدول ۳). بالاترین ضریب همبستگی کـانونی اول در صفات فیتوشیمیایی مربوط به میزان آنتـی اکسـیدانت (r=۰/۹۷۹۳) و در همبستگی کانونی دوم مربوط به میزان فنل می‌باشد. اولـین متغیـر کانونی در صفات فیتوشیمیایی با صفات تعداد میزان فنل، فلاونویید و آنتی اکسیدانت همبستگی مثبت داشت.

جدول ۲- همبستگی کانونی صفات ریخت‌شناسی ارقام ارکیده فالانوپسیس با دو متغیر کانونی معنی‌دار ریخت‌شناسی

Table 2- Canonical correlation of morphological traits of Orchid Phalaenopsis varieties with two morphological significant canonical variables

صفات ریخت‌شناسی Morphological traits	متغیرهای کانونی Canonical variables	
	کانونی اول First canon	کانونی دوم Second canon
تعداد ریشه Number of roots	0.91	0.27
تعداد برگ Number of leaves	0.92	-0.11
طول برگ Leaf length	0.95	0.09
طول ریشه Root length	0.96	-0.25
واریانس متغیر کانونی Variance of canonical variables	87.65	6.12

بنابراین نتیجه می‌گیریم هر چه به سمت کانون اول همبستگی‌ها نزدیک می‌شویم افزایش هر یک از صفات مورد مطالعه سبب افزایش سایر صفات می‌شود. در ارقام مورد مطالعه، کمترین میزان فلاونویید مربوط به رقم 'Memphis' و بیشترین میزان فلاونویید مربوط به رقم 'Nottingham' است. همچنین در دومین متغیر کانونی صفت میزان فنل کل با بیشترین ضریب با صفت میزان فلاونویید و آنتی اکسیدانت همبستگی منفی داشت که نشان می دهد در کانون دوم همبستگی ها هر چه میزان فنل اندام هوایی برگ بیشتر شود میزان فلاونویید و آنتی‌اکسیدانت کمتر خواهد شد. در دومین متغیر کانونی صفات میزان فلاونویید و آنتی اکسیدانت ها با متغیر کانونی دوم همبستگی کانونی مثبت داشت. یعنی هر چه به سمت کانون دوم همبستگی‌های بین صفات فیتوشیمیایی نزدیک می شویم رابطه بین صفات میزان فلاونویید و آنتی اکسیدانت‌ها با کانون دوم همبستگی مستقیم و مثبت می شود. از نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که متغیر کانونی اول بهتر می‌تواند همبستگی بین صفات فیتوشیمیایی را برازش کند.

جدول۳- همبستگی کانونی صفات فیتوشیمیایی ارقام ارکیده فالانوپسیس با دو متغیر کانونی معنی‌دار فیتوشیمیایی

Table 3- Canonical correlation of phytochemical traits of Orchid Phalaenopsis varieties with two significant phytochemical canonical variables

صفات فیتوشیمیایی Phytochemical traits	متغیرهای کانونی Canonical variables	
	کانونی اول First canon	کانونی دوم Second canon
میزان فنل کل Content of total phenol	0.97	−0.22
میزان فلاونویید Content of flavonoid	0.97	0.13
فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity	0.97	0.19
واریانس متغیر کانونی Variance of canonical variables	95.36	3.48

نتایج جدول ۴ برای بررسی معادلات متغیرهای کانونی استاندارد شده نشان داد که متغیرهای کانونی اول به عنوان مهمترین متغیر برای بررسی همبستگی بین صفات فیتوشیمیایی و ریخت‌شناسی ۵ رقم ارکیده فالانوپسیس مناسب است و پس از آن معادلات دوم و سوم می‌توانند با متغیرهای مختلف برای تعیین میزان همبستگی کانونی این صفات مورد توجه قرار گیردند. با بررسی معادله MOR_1 به نظر می‌رسد که MOR_1 عبارت از معادله‌ای که برای مقایسه‌ی X_1 (تعداد ریشه) با سایر متغیرهای X به کار می رود. پس MOR_1

نشان‌دهنده تعداد ریشه پنج رقم ارکیده فالانوپسیس می‌باشد. از طرف دیگر، $PHTY_1$ دارای ضریب بزرگ مثبت برای هر سه متغیر فیتوشیمیایی می‌باشد. به نظر می‌رسد که ظاهرا ارقام با تعداد ریشه بالا دارای بیشترین ترکیبات فنلی، فلانوئیدی و آنتی اکسیدانی می‌باشد. در همبستگی کانونی دوم ظاهرا کمی معادله پیچیده تر می‌شود و MOR_2 عبارت است از معادله ای که برای مقایسه X_2 با سایر متغیرهای X به کار می‌رود. پس X_2 نشان‌دهنده تعداد برگ کمتر در ۵ رقم ارکیده فالانوپسیس می‌باشد و از طرفی $PHTY_2$ دارای ضریب مثبت بزرگ برای Y_3 (مقادیر آنتی اکسیدانت) و ضریب منفی برای Y_1 (میزان فنل کل) می‌باشد. با توجه به همبستگی کانونی دوم می توان نتیجه گرفت که ظاهرا ارقام داری تعداد برگ کمتر میزان فنل کمتر و میزان آنتی‌اکسیدانت بیشتری دارند.

جدول ۴- معادلات متغیرهای کانونی استاندارد شده

Table 4- Equations of standard canonical variables

معادله Equation	فرمول Formula
MOR_1	$+0.91X_1+0.92X_2+0.95X_3+0.96X_4$
$PHTY_1$	$+0.97Y_1+0.97Y_2+0.97Y_3$
MOR_2	$+0.27X_1-0.11X_2+0.09X_3-0.25X_4$
$PHTY_2$	$-0.20Y_1+0.11Y_2+0.17Y_3$

نتایج جدول ۵ برای بررسی آزمون‌های معنی‌داری همبستگی کانونی صفات فیزیولوژیک تلقیح نشان داد که بیشترین مقادیر ویژه برای آزمون همبستگی با روش Hotelling-Lawley Trace می‌باشد. مقادیر ویژه برای آزمون‌های دیگر همبستگی Wilks' Lambda برابر ۰/۰۰۲، Pillai's Trace برابر با ۱/۹۰ و آزمون آماری Roy's Greatest Root برابر با ۶۵/۸۳ می‌باشد. در تمام آزمون‌های آماری مورد اشاره همبستگی کانونی برای صفات فیزیولوژیک و ریخت شناسی معنی‌دار شد.

جدول ۵- آزمون‌های معنی‌داری همبستگی کانونی برای صفات فیتوشیمیایی و ریخت‌شناسی ارقام ارکیده فالانوپسیس

Table 5- Significant tests of canonical correlations for phytochemical and morphological traits of Orchid Phalaenopsis varieties

آزمون‌ها Tests	مقادیر ویژه Special values	F	درجه‌آزادی Freedom degree	P value
Wilks' Lambda	0.002	15.66	12	<0.0001
Pillai's Trace	1.90	4.34	12	0.0005
Hotelling-Lawley Trace	70.53	43.75	12	<0.0001
Roy's Greatest Root	65.83	164.59	4	0.0001

بحث

ترکیبات فنلی بخش اعظمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند و بیشترین سودمندی آنها در خاصیت ضدسرطانی و آنتی اکسیدانی آنهاست (Dai and Mumper, 2010). فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات فنلی گیاه مانند اسیدهای فنلی، استیلین، تانن‌ها، لیگنان‌ها و لیگنین‌ها معمولا در برگ‌ها و بخش‌های چوبی مانند ساقه و شاخه وجود دارند. این ترکیبات به صورت مستقیم باعث مهار مولکول‌های فعال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسیل می‌گردند؛ همچنین گزارش شده است که گیاهان حاوی ترکیبات فلاونوئیدی هستند و فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی دارند (Sharma *et al.*, 2012). از خواص دارویی ارکیده‌ها به اثر ضد روماتیسم، ضد التهاب، ضد ویروس، ضد سرطان، ضد تشنج، ادرارآور، محافظت از مواد مغذی، آرامش، ضد پیری، ترمیم زخم، کاهش قند خون، ضد تومور، ضد میکروب، ضد باکتری، آنتی اکسیدان و ضد اسهال آن ها اشاره شده است (Moin *et al.*, 2012; Dalara *et al.*, 2015; Rokaya *et al.*, 2014; Bhattacharjee *et al.*, 2014; Ghanaksh and Kushiak, 1999; Bijaya, 2013; Islam *et al.*, 2013).

در مطالعات همبستگی کانونی بین صفات مورفولوژی و فیتوشیمیایی، ارتباط ساختاری همبستگی‌ها نتایج متفاوتی را نسبت به ضرایب کانونی استانداردشده ارائه می‌دهند. این نتایج متفاوت می‌تواند به علت پدیده هم‌خطی بین داده‌ها و یا کوچک بودن اندازه نمونه باشد و می تواند سبب ناپایداری ضرایب کانونی شود. به‌طور کلی ارتباط معنی‌دار برخی از صفات مورفولوژیک مانند تعداد ریشه بالا با اجزای تشکیل دهنده فیتوشیمیایی حاکی از آن است که می‌توان در برنامه‌های اصلاحی از گزینش غیرمستقیم برای صفات مورفولوژیکی برای بهبود و اصلاح صفات کیفی و داروئی گل ارکیده فالانوپسیس استفاده کرد. اهمیت این مسئله با توجه به هزینه بالا و دشواری اندازه‌گیری مواد موثره داروئی مشخص می‌گردد.

مطالعه همبستگی کانونی بین صفات ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی بین پنج رقم ارکیده فالانوپسیس برای اولین بار مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه بین ضرایب همبستگی کانونی صفات

ریخت شناسی در همبستگی کانونی اول نشان داد که با افزایش هر کدام از صفات ریخت‌شناسی (تعداد برگ، تعداد ریشه، طول برگ و طول ریشه) میزان ترکیبات فیتوشیمیایی مثل میزان فنل کل، فلاونوئید و آنتی اکسیدان ها افزایش یافت. در این مطالعه دو متغیر همبستگی کانونی اول و دوم به طور معنی‌داری صفات ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی را برازش کردند. نتایج این مطالعه مبنی بر معنی‌دار بودن دو همبستگی کانونی اول با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (Bidarnamani *et al*., 2020; Eghlima *et al*., 2019).

با توجه به اینکه گل ارکیده فالانوپسیس دارای ضایعات برگ و ریشه فراوانی هست یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که توجه به خاصیت دارویی این گل ارکیده ضایعات این گیاه را در گلخانه‌ها و مراکز تولید این گل کاهش دهد. در این مطالعه مقدار فنل، فلاونوئید و آنتی اکسیدان‌ها تعیین شد و همچنین ارتباط بین صفات ریخت شناسی و فیتوشیمیایی نشان داد که این گیاه دارای خاصیت دارویی است.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان فعالیت ضد اکسیدانی عصاره گل ارکیده فالانوپسیس رابطه مستقیمی با میزان فنل دارد و در واقع می توان گفت فعالیت ضد اکسیدانی این گیاه مربوط به فنل در آن می‌باشد. در واقع ترکیبات فنلی به عنوان الکترون دهنده عمل می‌کنند و از ایجاد واکنش‌های اکسیداتیو توسط رادیکال‌های آزاد جلوگیری میکنند (Jamshidi *et al*., 2010). نتایج این مطالعه مربوط به همبستگی مثبت بین ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با نتایج تحقیق شکراللهی و همکاران (Shokrollahi *et al*., 2018) ارتباط مستقیم دارد.

در مطالعه‌ای بر روی همبستگی کانونی بین صفات مورفولوژیک و اسانس‌های گیاه فرنجمشک (*Melissa officinalis*) نتایج معادلات همبستگی اول نشان داد ارتباط بالایی بین ترکیبات اسانس و صفات مورفولوژی وجود داشت که با همبستگی بین ترکیبات geranial و citronellal مرتبط بود، طبق نتایج این محققین دو ترکیب اخیر که خصوصیات داروئی دارند به‌طور غیرمستقیم با خصوصیات مورفولوژیک افزایش می یابند (Talle *et al*., 2012). مطالعه اکبریان و همکاران (Akbarian *et al*., 2017) بر روی همبستگی کانونی صفات فیتوشیمیایی و محیطی گیاه بیلهر (*Dorema aucheri*)، نتایج نشان داد ویژگی های محیطی از جمله ارتفاع و سیلتی بودن خاک و دما همبستگی مثبتی با متغیر کانونی اول نشان دادند؛ متغیر کانونی دوم با فلاونوئید و کلروفیل b با ویژگی‌های اقلیمی از جمله خاک رسی و اسیدیته همبستگی مثبت نشان داد. در مطالعه شکرپور و همکاران (Shokrpour *et al*., 2008) به ارتباط همبستگی مثبت بین صفات مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و مولکولی در گیاه ماریتیغال اشاره شده است و نتایج نشان داد که دو متغیر کانونی اول و دوم دارای همبستگی کانونی معنی‌داری بودند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

استفاده از ارکیده در طب سنتی در آسیا، آفریقا، خاورمیانه، آمریکا و اروپا مشاهده شد و خواص دارویی که برای گیاه در این کشورها بررسی شده است شامل درمان هیستری، آسم، جنون و صرع، بیماری‌های روماتیسم، سل، تب‌خال، اگزمای پوستی، اختلالات قلبی، تنفسی و عصبی می‌باشد. در این تحقیق مشخص شد که ارقام ارکیده فالانوپسیس از محتوای فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبتا خوبی برخوردار است و بین صفات ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی همبستگی کانونی مثبت بالایی برقرار بود و با افزایش طول یا تعداد برگ محتوی ترکیبات فیتوشیمیایی افزایش یافت. همچنین با توجه به یافته‌های این مطالعه و یافته‌های مشابه در سایر محققین مشخص شد که تولید متابولیت‌های ثانویه گل ارکیده و سایر گیاهان تحت تاثیر شرایط ژنتیکی و محیطی بر تولید و مقادیر ترکیبات شیمیایی موجود و عملکرد دارویی گیاهان می‌تواند موثر باشد. با استفاده از نتایج همبستگی بین صفات مورفولوژی و فیتوشیمیایی در گیاهان، اصلاح‌گران می‌توانند گیاهان با عملکرد رویشی بالاتر را به منظور رسیدن به عملکرد فیتوشیمیایی بیشتر انتخاب کنند.

سپاسگزاری

این مقاله با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه زابل با شماره گرنت IR-UOZ-GRANT-6918 انجام شده است.

منابع

1. Akbarian A., Rahim-malek M., Sabzalian M.R., and Saeidi G.H. 2017. Assessment of phytochemical, morphological and antioxidant variation of bilehar (*Dorema aucheri*) population cultivated in different environmental conditions. Journal of Medicinal Plants 16(62): 120-135. (In Persian with English abstract)
2. Barros L., Baptisia P., and Ferreira I.C.F.R. 2007. Effects of fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays, *Lactarius piperatus.* Food and Chemical Toxicology 45(9):1731-1737. DOI: 10.1016/j.fct.2007.03.006.

3. Bhattacharjee B., Islam T., Rahman Z., and Islam S.M.S. 2015. Antimicrobial activity and phytochemical screening of whole plant extracts of *Vanda tessellata* (Roxb). Journal of Pharmaceutical Science 4: 72–83.
4. Bidarnamani F., Mortazai S.N., and Rahimi M. 2020. Study of correlation and cluster analysis of seed germination characteristic in 5 cultivars of phalaenopsis orchid in Chen medium. Flower and Ornamental Plants 4(2): 101-114. (In Persian with English abstract). DOI: 10.29252/flowerjournal.4.2.101.
5. Bijaya P. 2013. Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. African Journal of Plant Science 7: 448–467. DOI: 10.5897/AJPS2013.10.
6. Bursal E., and Koksal E. 2011. Evaluation of reducing power and radical scavenging of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). Food Research International 44: 2217-2221.
7. Dai J., and Mumper R.J. 2010. Plant phenolics extraction, analysis and their antioxidant and anti-cancer properties. Molecules 15: 7313-52. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.001.
8. De La Torre B.G., and Albericio F. 2020. The pharmaceutical industry in 2019. An analysis of FDA drug approvals from the prespective of molecoles. Mulecules 25(745): 1-13. DOI: 10.3390/molecules25030745.
9. Dalara A., Guoa Y., Esimd N., Bengue A.S., and Konczak I. 2015. Health attributes of an endemic orchid from Eastern Anatolia, Dactylorhiza chuhensis Renz & Taub In vitro investigations. Journal of Herbal Medecine 5: 77–85. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.02.001.
10. Do Q.D., Angkawijaya A.E., Tran-Nguyen P.L., Huynh L.H., Soetaredjo F.E., Ismadji S., and Ju Y.H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content totla falvonoid content and antioxident activity of *Limnophia aromatic*. Journal of Food and Drug Analysis 22: 296-302. DOI: 10.1016/j.jfda.2013.11.001.
11. Eghlima G.H., Kheiry A., Sanikhani M., Hadian J., and Alaaei M. 2019. Assessment of genetic variation and grouping of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) population using canonical discriminant analysis. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 35(4): 677-690. In Persian with English abstract. (In Persian with English abstract). DOI: 10.22092/ijmapr.2019.125045.2486.
12. Firouzkuhi F., Esmailzadeh Bahabadi S., Mohkami Z., and Yosefzaei F. 2018. The effects of different solvents on total phenolic, Flavonoid contents and antioxidant activity of different organs of *momordica charantia* L., cultures in Sistan region. Journal of medicinal plants Ecophytochemistry 5(4):74-85. (In Persian with English abstract)
13. Ghanaksh A., and Kaushik P. 1999. Antibacterial effect of Aerides multiflora Roxb: A study in vitro. The Journal of Orchid Society of India 1: 65–68.
14. Islam M.S., Mehraj H., Roni M.Z.K., Shimasaki K., and Uddin A.F.M.J. 2013, Correlation between cane growth and flowering behavior of Dendrobium orchid cultivars. Journal of Bangladesh Academy Science 37: 205–209.
15. Jamshidi M. A., Ahmadi-Ashtiani H.R., Rezazadeh S.H., Fathiazad F., Mazandarani M.A., and Khaki A.R. 2010. Study on Phenolics and Antioxidant Activity of some Selected Plant of Mazandaran Province. Journal of Medicinal Plants (34): 177-82. (In Persian)
16. Kala S., and Senthilkumar S. 2010. Antimicrobial activity of Acanthephippi *Acanthephippium bicolor* Lindley. Malaysian Journal of Microbiology 6(2): 140-148.
17. Ling L.F., and Subramaniam S. 2007. Biochemical analysis of *phalaenopsis violacea* orcchis. Asian Journal of Biochemistry 2: 237-246. DOI: 10.3923/ajb.2007.237.246.
18. Minh T.N., Khangm D.T., Tuyen P.T., Minh L.T., Anh L.H., Quan N.V., Ha P.T.T., Quan N.T., Toan N.P., Elzaawely A.A., and Xuan T.D. 2016. Phenolic compounds and antioxidant activity of *phalaenopsis* orchid hybrids. Antioxidants 5(3): 31-42. DOI: 10.3390/antiox5030031.
19. Moin S., Sahaya B.S., Servin P.W., and Chitra B.D. 2012. Bioactive potential of *Coelogyne stricta* (D.Don) Schltr: An ornamental and medicinally important orchid. Journal of Pharmacological Research 5: 2191–2196.
20. Nile S.H., and Park S.W. 2013, Total phenolics, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of three colored onions (*Allium cepa* L.). Frontiers in Life Science 7: 224-228. https://doi.org/10.1080/21553769.2014.901926.
21. Pant B., Adhikari R., and Thapa S. 2014. Application of plant cell and tissue culture for the production of phytochemicals in medicinal plants. Application of Plant Cell and Tissue Culture 25-41. DOI: 10.1007/978-81-322-1774-9_3.
22. Pant B., Pradhan S., and Paudel M.R. 2019. Various culture techniques for the mass propagation of medicinal orchids from Nepal. Acta Horticulture 109-124. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1262.16.
23. Paudel M.R., Joshi P.R., Chand K., Sah A.K., Acharya S., Pant B., and Pant B. 2020. Antioxident, anticancer and antimicrobial effects of in vitro developed protocorms of *Dendrobium longicornu*. Biotechnolgy Reports 28: 1-7. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00527.
24. Rao S.R., and Ravishankar G.A. 2002, Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances 20(2): 101-53. DOI: 10.1016/s0734-9750(02)00007-1.
25. Riggs T.J. 1973. The use of canonical analysis for for selection within a cultivar of spring barley. Annals of Applied Biology 74(2): 249-258.
26. Rokaya M.B., Uprety Y., Poudele R.C., Timsina B., Münzbergová Z., Asselind H., Tiwari A., Shresthac S.S., and Sigdeli S.R. 2014. Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. Journal of

Ethnopharmacology 158:221–229. doi: 10.1016/j.jep.2014.10.014.

27. Sharma R., Samant S., Sharma P., and Devi S. 2012. Evaluation of antioxidant activities of *Withania somnifera* leaves growing in natural habitats of Northwest Himalaya India. Journal of Medicinal Plants Research 6(5): 657-661. DOI: 10.5897/JMPR11.257.
28. Shokrpour M., Mohammadi S.A., Moghaddam M., Ziai S.A., and Javanshir A. 2008, Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybum marianum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 24(3): 278-292. (In Persian with English Abstract)
29. Shokrollahi S.H., Heshmatii G.H., and Yosefzadeh H. 2018. Study the phenolic compounds and antioxidant activity of the extract lily (*Lilium ledebouri*) (Baker). Journal of Fasa University of Medical Sciences 8(2): 727-734. (In Persian with English Abstract)
30. Talle B., Darvish F., Mohammadi A., Abbaszadeh B., and Rohami M. 2012. Assessment of relationship between effective traits on yield and compounds of essential oil and morphological triats of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) accessions using path analysis and canonical correlation. Journal of Basic and Applied Scientific Reseach 2(4): 3719-3723. https://doi.org/10.17485/ijst%2F2013%2Fv6i5%2F33244.
31. Yang H.S., Han D.K., Kim J.R., and Sim J.C. 2006. Effects of α-tocopherol on cadminum-induced toxicity in rat testis and spermatogenesis. Journal of Korean Medicinal Science 21(3): 445. doi: 10.3346/jkms.2006.21.3.445.
32. Yeater K.M., Bollero G.A., Bullock D.G., Rayburn A.L., and Rodriguez-Zas S. 2004. Assessment of genetic variation in hairy vetch using canonical discriminant analysis. Crop Science 44: 185-189. https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1850.